

Title	Structure-function analysis of human IL-6 receptor : dissociation of amino acid residues required for IL-6-binding and for IL-6 signal transduction through gp130
Author(s)	八幡, 英夫
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39454
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照 ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	八 幡 英 夫
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 0 3 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 7 年 6 月 7 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	Structure - function analysis of human IL - 6 receptor : dissociation of amino acid residues required for IL - 6 - binding and for IL - 6 signal transduction through gp130 (ヒトIL-6レセプターの構造機能解析: IL-6の結合とIL-6シグナルの伝達に必要なアミノ酸残基の分離)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岸 本 忠 三 (副査) 教 授 宮 坂 昌 之 教 授 平 野 俊 夫

論 文 内 容 の 要 旨

【目 的】

多機能サイトカインであるIL-6は、標的細胞表面上の特異的なレセプター系を介してその機能を発揮する。IL-6のレセプター系はいわゆるサイトカインレセプターファミリー (CRF) に属する2つの膜貫通型蛋白質、すなわちIL-6Rとgp130から成る。IL-6がIL-6Rの細胞外領域に結合すると、IL-6Rとgp130は互いの細胞外領域を介して会合し、その結果gp130によりIL-6の情報が細胞内に伝達される。即ちIL-6Rの細胞外領域は、IL-6との結合、および情報伝達のためのgp130との会合という2つの役割を担っている。これらの役割にIL-6Rの細胞外領域のどのような構造がどのように関与しているのかを知るために、この領域の構造機能解析を行った。

【方法ならびに成績】

(1) IL-6との結合に関与するドメインの同定

ヒトIL-6Rの細胞外領域はN末端側の免疫グロブリン (Ig) ドメイン (アミノ酸残基~20から~110) と細胞膜側のCRFドメイン (同~110から~330) の2つのドメインに分けられる。そのどちらがIL-6との結合に関与しているかを解析するために、各々のドメインを欠失したヒトIL-6R変異体IL-6R Δ Ig (Δ 27 - 105) およびIL-6R Δ Fam (Δ 124 - 342) のcDNAを作製し、これらのIL-6R変異体および野生型ヒトIL-6RをcDM8ベクター/COP細胞系にて一過性に発現させ、ビオチン化ヒトIL-6とFITC-アビジンで染色後、FACSにて解析した。その結果、IL-6R Δ Famを発現したCOP細胞は染色されず、野生型IL-6およびIL-6R Δ Igを発現したCOP細胞は同程度に染色された。以上の結果よりIL-6Rにおいて、IgドメインはIL-6との結合には不要であり、CRFドメインがIL-6との結合能を担っていることが解った。

(2) IL-6シグナルの伝達に関与するドメインの同定

IL-6との結合能を担うCRFドメインがIL-6シグナルの伝達に必要十分であるか否かを調べるために、野生型ヒトIL-6R cDNAおよび上記IL-6R Δ Ig cDNAをそれぞれpZipNeoベクターに挿入し、マウス培養細胞株M1に導入してtransfectant M1IL-6RおよびM1IL-6R Δ Igをそれぞれ得た。M1, M1IL-6RおよびM1IL-6R

Δ Ig の細胞表面上の IL-6 結合部位数はそれぞれ細胞あたり約 50, 約 6700, 約 2600 であった。M1 細胞は IL-6 に応答してマクロファージへと分化して増殖を停止し、³H チミジンの取り込みも停止する。この増殖停止を指標として M1IL-6R および M1IL-6R Δ Ig の IL-6 に対する感受性を調べると、親株 M1 に対してそれぞれ約 36 倍、約 15 倍の感受性を示した。この IL-6 感受性の増大は細胞表面上の IL-6 結合部位数の多少とよく相関していることから、ヒト IL-6R において CRF ドメインが IL-6 シグナルの伝達に必要十分であることが示唆された。

(3) CRF ドメイン中の IL-6 との結合に関与するアミノ酸の同定

遺伝子工学的に作製した可溶性 IL-6R は、IL-6 との結合と情報伝達のための gp130 との会合という IL-6R の 2 つの機能を保持している。そこで IL-6R の CRF ドメイン中の IL-6 結合に関与するアミノ酸を同定するために、*in vitro* mutagenesis によりアミノ酸置換を導入した種々の可溶性 IL-6R 変異体 cDNA を作製して pSVL ベクター/COS7 細胞系にて各可溶性 IL-6R 変異体を一過性に発現させ、IL-6 結合能を解析した。即ち、各 COS7 培養上清を IL-6 との結合を阻害しない抗ヒト IL-6R モノクローナル抗体 MT18 をコートしたタイタープレートに加えて各変異体をトラップ後、¹²⁵I 標識 IL-6 結合量を測定した。その結果、置換したアミノ酸 101 個中、39 個が IL-6 結合に必要なと考えられた。IL-6R が属する CRF の提唱者 Bazan が提出した CRF ドメインの立体構造モデルによると、CRF ドメインは 7 つの β ストランドとそれらを連結するループ領域より形成される「樽型」のモジュールが 2 つ繋がった構造をとる。IL-6R の IL-6 結合に必要な 39 個のアミノ酸の位置をこのモデルにあてはめると、そのうち CRF に特徴的な 'WSXWS' モチーフを含む 23 個が 2 つのモジュールを繋ぐヒンジ領域付近に位置した。また、IL-6 結合に必要なアミノ酸のうち β ストランド上に位置すると考えられる 22 個中 CRF に特徴的な 4 つの Cys 残基のうち 3 つを含む 17 個が 2 つの「樽型」モジュールの一側面上に偏って位置していた。

(4) IL-6 シグナルの伝達能を失った可溶性 IL-6R 変異体

IL-6 反応性マウス細胞株 NFS60 にヒト gp130 cDNA を発現ベクター pZipNeo を介して導入し、NFS130 細胞株を作製した。NFS130 細胞の IL-6 存在下での可溶性 IL-6R 濃度依存的 ³H チミジンの取り込みの増大は、親株の NFS60 細胞に比べてより高い感度を示した。この NFS130 細胞の培養液に (3) で得た各種可溶性 IL-6R 変異体を含む培養上清を IL-6 と共に加えて 2 日間培養後、³H チミジンの取り込みの増強を指標に可溶性 IL-6R 変異体の IL-6 シグナルの伝達能を評価した。評価の結果、(3) で IL-6 結合能を保持していた可溶性 IL-6R 変異体 42 種中、7 種では IL-6 シグナルの伝達能が失われていた。この 7 種の変異体で置換されているアミノ酸 7 個を上記の立体構造モデルにあてはめると、7 個中 6 個は第 2 モジュールの細胞膜に近い部位に集中していた。

この 7 種の可溶性 IL-6R 変異体が IL-6 シグナルの伝達能を失った原因を調べるために、これら変異体の IL-6 存在下での gp130 結合能を評価した。¹²⁵I 標識可溶性 gp130 を IL-6 と共に野生型及び各変異体を含む濃縮培養上清と混合・インキュベートした後、抗ヒト IL-6R モノクローナル抗体 MT18 を用いて免疫沈降した。その結果、¹²⁵I 標識可溶性 gp130 は野生型の可溶性 IL-6 により免疫沈降されたが、IL-6 シグナルの伝達能を失った 7 種の可溶性 IL-6R 変異体によっては沈降されなかった。したがって、これらの可溶性 IL-6R 変異体は IL-6 には結合できても gp130 に結合できないために IL-6 シグナル伝達能を失っていることが示唆された。

【総括】

本研究において、欠失変異体およびアミノ酸置換変異体の作製によりヒト IL-6R の構造機能解析を行った。その結果、(i) IL-6R の細胞外領域が持つ IL-6 との結合および情報伝達のための gp130 との会合という 2 つの役割がいずれも IL-6R の CRF ドメインにより担われていること、(ii) CRF ドメイン中の IL-6 結合に関与すると考えられる 39 個のアミノ酸および関与しないと考えられる 62 個のアミノ酸、(iii) IL-6 結合能を有しているものの IL-6 シグナルを伝達できない 7 個の可溶性 IL-6R 変異体、(iv) (iii) の変異体が IL-6 シグナルを伝達できない原因が IL-6 結合後シグナル伝達因子である gp130 と会合できないためであること、を見いだした。さらに、CRF ドメイン中の IL-6 結合に関与すると考えられるアミノ酸の立体的位置や gp130 との会合に必要な 7 個のアミノ酸の立体的位置を、CRF の立体モデル上にあてはめると、それぞれ一定の偏った部位に位置していることから、これらのアミノ酸の IL-6R の立体構造の維持や IL-6 との直接的相互作用、また IL-6 結合後の gp130 との会合における役割が推察

された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、多機能性サイトカインIL-6のレセプター系を構成する2種類の膜貫通型蛋白のうち、リガンドであるIL-6分子の結合と情報伝達のためのgp130分子への会合という2つの機能を持つIL-6レセプターの細胞外領域の構造機能解析を行ったものである。本研究では、まず欠失変異体の作製により上記2つの機能がいずれもサイトカインレセプターファミリドメインのみにより担われていることを明らかにし、次にアミノ酸置換変異体を多数作製してそれぞれの機能に関与するアミノ酸野同定を行っている。その結果、サイトカインレセプターファミリーに特徴的な4つのシステイン残基やWSXWSモチーフがIL-6の結合に重要なこと、IL-6結合に必要なアミノ酸残基とgp130との会合に必要なアミノ酸残基が別個に存在すること、などが示された。さらに、これらのアミノ酸残基の立体的位置とその役割についての立体モデルを用いた議論がなされている。本研究の成果は、サイトカインレセプターファミリーにおける情報伝達のためのリガンド分子・レセプター分子・シグナル伝達分子の相互作用様式について一つの普遍的なモデルを提唱するものであり、その学問的価値は非常に高いと考える。よって本研究は学位の授与に値するものと考えられる。